

UNIVERSITATEA DIN CRAIOVA

Contract de cercetare IDEI COD 430

**Titlul: „ CERCETARI PRIVIND FORMAREA
FRUCTULUI PRIN APOMIXIE LA SOIURI DE
NUC AUTOHTONE ”**

**Director proiect,
Conf. univ. dr. COSMULESCU Sina Niculina**

**FAZA 2010
- SINTEZA-**

**LUCRARI PUBLICATE
2010**

Cosmulescu S., Trandafir I., Achim G., Botu M., Baci A., Gruia M. 2010. <i>Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits</i> . Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, Vol. 38 (1): 53-56. Print ISSN 0255-965X; Electronic ISSN 1842-4309 (http://notulaebotanicae.ro/nbha/article/viewArticle/4624).
Cosmulescu Sina, Baci A., Botu M., Achim Gh. 2010. <i>Environmental factors' influence on walnut flowering</i> . Acta Hort. (ISHS) 861:83-88 http://www.actahort.org/books/861/861_10.htm . Indexare în ISI Proceedings - Science & Technology Edition și Bazele de Date Internaționale Reprezentative - AGRICOLA și CAB Abstracts®.
Botu M., Tudor M., Papachatzis A. 2010. <i>Evaluation of some walnut cultivars with different bearing habits in the ecological conditions of Oltenia – Romania</i> . Acta Hort. (ISHS) 861:119-126 http://www.actahort.org/books/861/861_15.htm Indexare în ISI Proceedings - Science & Technology Edition și Bazele de Date Internaționale Reprezentative - AGRICOLA și CAB Abstracts®
Cosmulescu S., Simeanu C., Achim G. 2010. <i>Embriologic and cytologic studies on fruit setting in walnut tree (Juglans regia L.)</i> . Analele Universitatii din Craiova Biology, Horticulture, Food Produce Processing Technology, Environmental Engineering, volXV(1):185-188 (http://www.anucraiova.3x.ro/cont.html). Indexare în CAB Abstracts and Global Health (by CAB International), Zoological Record (by Thomson Reuters), Index Copernicus
Botu M., Tudor M., Botu I., Cosmulescu S., Papachatzis A. 2010. <i>Evaluation of walnut cultivars in the conditions of the Oltenia's hill area regarding functioning potential</i> . Analele Universitatii din Craiova Biology, Horticulture, Food Produce Processing Technology, Environmental Engineering, volXV(1):94-103 (http://www.anucraiova.3x.ro/cont.html). Indexare în CAB Abstracts and Global Health (by CAB International), Zoological Record (by Thomson Reuters), Index Copernicus
Cosmulescu Sina, Baci Adrian, Botu Mihai, Achim Gheorghe, Trandafir Ion, Gruia Marius. 2010. <i>Polyphenols - Potential Markers For Determining The Genetic Diversity In Walnut</i> . Lucrari Stiintifice Universitatea Agrara de Stat din Moldova, Facultatea de Horticultura vol. 24(1):19-25, ISBN 978-9975-64-191-3.

SPRE PUBLICARE

S.N. COSMULESCU, I. TRANDAFIR, M. BOTU and G. ACHIM. <i>Juglone content in walnut (Juglans regia L.) cultivars</i> . Allelopathy Journal (http://www.allelopathy-journal.com/allelopathy.aspx) ISSN 0974-1240, Factor de impact 0,793.
Cosmulescu Sina, Trandafir I., Botu M., Achim Gh., Baci A. <i>Phenols content in mature leaves of walnut (Juglans regia L.) cultivars</i> . Horticultural Science, ISSN 0862-867X (http://journals.uzpi.cz/web/HORTSCI.htm), Factor de impact 0,600.
Sina Cosmulescu, Mihai Botu, Ion Trandafir. 2010. <i>Mineral composition and physical characteristics of walnut (Juglans regia L.) cultivars originating in Romania</i> . Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences ISSN: 1309-0550 http://www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs/index.php/ziraat/index
Sina COSMULESCU, Ion TRANDAFIR, Mihai BOTU, Gheorghe ACHIM, Adrian BACIU. 2010. <i>Variation of phenols content in walnut (Juglans regia L.)</i> . South-Western Journal of Horticulture, Biology & Environment (http://anucraiova.3x.ro/swjhbe/index.html), P-ISSN: 2067-9874, International coverage: Zoological Record (by former ISI), Index Copernicus.

OBȚINEREA FRUCTELOR APOMICTICE. STUDII EMBRIOLOGICE SI CITOLOGICE LA FRUCTELE APOMICTICE. STUDIUL DESCENDENTEI PRIN MARCHERI BIOCHIMICI

Materialul biologic

Experiențele au fost amplasate la Universitatea din Craiova (SCDP Vâlcea: 45°07' latitudine nordică 24°22'21" longitudine estică, foto 1-3). Au fost folosite soiuri de origine diferită și hibridi apomictici, incluzând toate tipurile de dihogamie: protandrie, protoginie, homogamie.



Foto 1-3: Imagini din câmpul de cercetare

Metode de lucru

Din literatura de specialitate, reiese faptul că apomixia este influențată de perioada de înflorire, dar și de factorii de mediu. Pentru a determina particularitățile fenologice ale mugurilor micști femeiești și mugurilor amenți, au fost efectuate observații fenologice în câmp, stabilindu-se datele calendaristice la care s-au înregistrat stadiile reper, folosind ca element de comparație stadiile reper elaborate de Bergaunoux și Grosperre (1975). Pentru determinarea procentului de apomixie, izolarea florilor a fost efectuată înainte de bifurcarea stigmatelor. S-a folosit hârtia de pergament, o mare parte din pungii se distrug parțial în timpul ploilor și vânturilor ce au loc în perioada de înflorire a nucului. Desfacerea pungilor a fost efectuată când stigmatetele erau complet uscate (foto 4-5).



Foto 4-5: Desfacerea pungilor de izolare (imagini câmp)

Pentru secțiuni prin fructul apomictic și fructul normal dezvoltat, au fost recoltate fructele, fixate în fixatorul FAA (80% etanol : 10% acid acetic glacial : 10% formol) și ținute la frigider. Secțiunile transversale și longitudinale au fost vizualizate la microscop și fotografiate.

Pentru studiul diversității genetice, s-a elaborat protocolul de lucru pentru utilizarea polifenolilor în analiza taxonomică. Obiectivul a fost să dezvolte o metodă cromatografică care să permită identificarea fructelor apomictice și clasificarea taxonomică, metodă bazată pe analiza HPLC și compararea profilurilor de fenoli, iar pe baza acestora stabilirea diversității genetice. Pentru identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi s-a adoptat tehnica cromatografiei lichide de înaltă performanță în fază inversă, HPLC-RP. Pentru analiza și interpretarea datelor s-a folosit programul Microsoft Excel (descriptive statistics), NCSS (analiza cluster / dendograma) și XLSTAT 2007 (PCA Analysis).

Rezultate obținute

Nucul, fiind o plantă monoică, la care fenomenul de dihogamie este bine exprimat, cercetările au pus în evidență faptul că variația factorilor climatici în perioada deschiderii florilor masculine au o importanță majoră. Au fost luate în studiu soiuri de origini diferite; tipul de înflorire și fructificare, vigoarea

de creștere sunt prezentate în tabelul 1. Pentru soiurile românești predomină tipul protogin, la soiurile străine tipul protandru. Tipul de fructificare predominant este cel terminal. În zona de cercetare, înflorirea soiurilor de nuc are loc, de obicei, între 04 aprilie și 21 mai (media pe o perioadă de cinci ani). În această perioadă nu se înregistrează înghețuri târzii. Între soiurile cu fructificare laterală și cele cu fructificare terminală nu există mai mult de 4 până la 10 zile diferență de sincronizare la înflorire.

Tabelul 1: Tipul de înflorire și fructificare la soiuri de nuc studiate

Nr.crt	Soi	Origine	Vigoarea	Tip de dihogamie	Tipul de fructificare
1	'Sarmis'	Romania	Mare	Protogin	terminal
2	'Sibișel 44'	Romania	Mare	Protogin	terminal
3	'Valcor'	Romania	Mare	Protogin	terminal
4	'Valmit'	Romania	Mare	Protogin	terminal
5	'Valrex'	Romania	Mare	Protogin	terminal
6	'Jupânești'	Romania	mare	Protogin	terminal
7	'Argeșean'	Romania	Foarte mare	Protogin	terminal
8	'Geoagiu 65'	Romania	Foarte mare	Protogin	terminal
9	'Germisara'	Romania	Medie	Protogin	intermediar
10	'Muscelean'	Romania	Mare	Protandru	terminal
11	'Orăștie'	Romania	Medie	Protogin	terminal
12	'Velnița'	Romania	Medie	Protogin	terminal
13	'Franquette'	Franta	Mare	Protandru	terminal
14	'Ferjean'	Franta	Mare	Protandru	lateral
15	'Fernette'	Franta	Mare	Protandru	lateral
16	'Fernor'	Franta	Mare	Protandru	lateral
17	'Lara'	Franta	Mare	Protandru	lateral

Procentul fructelor apomictice obținute a fost sub 10% la toate soiurile, ceea ce confirmă faptul că la nuc nu se pot aștepta producții economice prin apomixie. Literatura de specialitate arată faptul că la soiurile protandre apomixia este mai frecventă decât la cele protogine. La soiurile românești se manifestă frecvent fenomenul de protoginie, ceea ce poate fi o explicație a procentului de fructe apomictice destul de scăzut. În legătură cu perioada de înflorire, este cunoscut faptul că genotipurile cu înflorire tardivă formează mai des fructe partenocarpice decât cele cu înflorire timpurie. Acest lucru poate explica fenomenul de formare a fructelor la soiuri altoite din pepinieră, ce au o înflorire târzie (foto 6), când se constată, de regulă, lipsă de polen.



Foto 6: Formarea fructelor apomictice

La nuc, formarea fructului are loc în paralel cu parcurgerea proceselor de embriogeneză și endospermogeneză. Fotografiiile 7-11 prezintă secțiuni prin fructul polenizat și fructul apomictic la soiul Jupânești. La fructul apomictic (foto 9), soiul 'Jupânești', epiderma este unistratificată și prevăzută cu cuticula groasă. Celulele taninifere pătrund în mezocarp (foto 11). Mezocarpul este alcătuit din celule sferoidale și ovoidale cu mici spații între ele și cu numeroase cloroplaste în interior (foto 8 și 10). Nu se observă diferențe semnificative între

fructul apomictic și polenizat.

Foto 7: Soiul 'Jupânești' (polenizat): epiderma și mezocarp (40x10)	Foto 8: Soiul 'Jupânești' (polenizat): porțiune de mezocarp mărită (40x10)	Foto 9: Soiul 'Jupânești' (apomictic): epiderma, epicarp, celule taninifere (40x10)	Foto 10: Soiul 'Jupânești' (apomictic): mezocarp (40x10)	Foto 11: Soiul 'Jupânești' (apomictic): cuticula, epiderma, epicarp, celule taninifere, mezocarp (40x10)

Studiul descendenței prin markeri chimici (chemotaxonomie). Stabilirea protocolului de lucru.

Chemotaxonomia este o ramură a taxonomiei care urmărește clasificarea plantelor pe criterii chimice. Marcherii chimici au fost pe larg utilizați în studii de botanică chemosistematică. Posibilitatea de a folosi compuși fenolici ca markeri chimici a fost printre primele menționate de Hubáček și Lachman (1977). Din punct de vedere taxonomic, fenolii s-au dovedit a fi cei mai populari tipuri de metaboliti secundari (Smith, 1976), iar numărul de studii chemosistemice pe baza acestor marcheri au fost pe larg raportate. Principalul motiv pentru popularitatea lor este extracția lor rapidă și simplă din materialul vegetal. De asemenea, aceștia sunt relativ ușor de separați prin cromatografie și sunt ușor identificați prin reactivi de locație (Smith 1976). Fenolii prezenți în țesutul plantelor sunt caracteristice speciilor, și de aceea au valoare taxonomică.

Utilizarea polifenolilor ca marcheri în chemotaxonomie, care să permită diferențierea dintre familiile și chiar cultivarii, a fost în prealabil demonstrată (Van Sumere și colab. 1993; Venkataraman, 1994) la specii diferite. Jay-Allemand și colab. (1988) a găsit trei rapoarte între cinci polifenoli, care au fost asociate cu reținerea la nuc. Ulterior, Claudot și colab. (1992) a constatat că glucosidele hidrojuglone și myricitrin sunt marcheri buni de vârstă fiziologică la nuc. Principalele criterii de diferențiere a soiurilor la nuc, folosite frecvent, au fost caracteristicile morfologice și agronomice, caracteristici influențate în mare parte de condițiile de mediu. Prasad (2003) consideră că fructele de nuc sunt bogate în compuși fenolici. Compoziția în polifenoli este în principal determinată de factori genetici (Solar et al., 2006), cu toate acestea, conținutul de fenoli este influențat și de locația geografică, de condițiile climatice (Amaral, 2008). Conținutul în polifenoli este influențat și de fenofaza de vegetație, acesta fiind mai scăzut către sfârșitul perioadei de maturitate în mezocarpiul fructelor mature (Cosmulescu et al., 2010).

Pornind de la această idee, al utilizării polifenolilor în analiza taxonomică, obiectivul a fost să dezvolte o metodă cromatografică care să permită identificarea fructelor apomictice și clasificarea taxonomică, metodă bazată pe analiza HPLC și compararea profilurilor de fenoli, iar pe baza acestora stabilirea diversității genetice.

S-a realizat extracția, identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi din frunze și mezocarpi de nuc de la șapte soiuri diferite. Probele au fost recoltate la începutul lunii septembrie și au fost conservate prin congelare la temperatura de -40°C . Probele, formate din produsele vegetale fin mărunțite, în cantitate de 500 mg cântărite cu precizie de 0,0001, introduse în vase conice împreună cu 20 mL metanol cu 1% BHT(2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol), acoperite cu parafilm și folie de aluminiu, s-au menținut la temperatura de 25°C pe o baie cu ultrasunete timp de 40 minute. Extractele s-au separat prin centrifugare la 1200 g folosind o centrifugă HERMLE Z 233 MK-2. Supernatantele au fost filtrate prin membrane de poliamidă cu diametrul porilor de $0,22\ \mu\text{m}$ și stocate la temperatura de -20°C .



Foto 12: Sistemul HPLC-SURVEYOR Plus

Pentru identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi s-a adoptat tehnica cromatografiei lichide de înaltă performanță în fază inversă, HPLC-RP. În acest sens a fost utilizat un sistem HPLC-SURVEYOR Plus, produs de firma Thermo Electron (Foto 12), configurat cu pompa cuaternară și degazor de vid incorporat **SRVYR-LPMPP**, autosampler termostatat Peltier **SRVYR-ASP**, detector UV-VIS cu sir de diode și celulă în flux de 5 cm, **SRVYR-PDA5P**, coloană Chromsep HPLC (250x4.6 mm, Hypersil 5 BDS) și software CHROMQUEST pentru controlul instrumentului, diagnostic, achiziția și procesarea datelor.

S-au utilizat următoarele standarde externe: acid ferulic (Fluka Chemie GmbH), acid vanilic(Sigma-Aldrich Chemie GmbH), acid coumaric(Sigma), acid elagic(Fluka), myricitrină (Sigma) și juglonă, 5-hidroxy-1,4-naphthoquinone (Aldrich). Pentru faza mobilă s-a folosit acetonitril (Baker) acid acetic (Merck) și apă ultrapură obținută cu un sistem SG-Water. Soluțiile etalon sau obținut prin dizolvarea standardelor în metanol (Merck) și metanol:acetonitril 50:50 (v/v) în cazul acidului elagic. Faza mobilă a fost filtrată printr-o membrană de poliamidă $0,2\ \mu\text{m}$ și degazată cu ajutorul unei băi de ultrasunete DK 102p Bandelin. Înainte de injectare, probele au fost filtrate prin filtre de seringă din nylon CRS $0,45\ \mu\text{m}$. Pentru identificare s-a realizat scanarea și înregistrarea spectrului în domeniul 230-450 nm, determinarea timpului de retenție pentru fiecare standard și compararea cu datele obținute în cazul probelor reale. Cuantificarea s-a realizat prin metoda standardului extern sau interpolarea pe baza curbei de calibrare stabilită pentru fiecare compus, în domeniul 0-40 p.p.m. Au fost măsurate probe reale și probe cu adaos cunoscut de substanțe etalon. Condițiile de lucru cromatografice au fost stabilite pe baza metodei Schieber și

colab. (2001) la care au fost făcute mici modificări. S-a aplicat un regim gradient, în care solventul A este apă cu 5% (v/v) acid acetic, solventul B acetoneitril:apă 50:50(v/v) cu 0,5% acid acetic. Probele și coloana au fost termostatate la 25 °C, debitul de eluent stabilit la 1mL/min, iar volumul de injecție 20 µL.

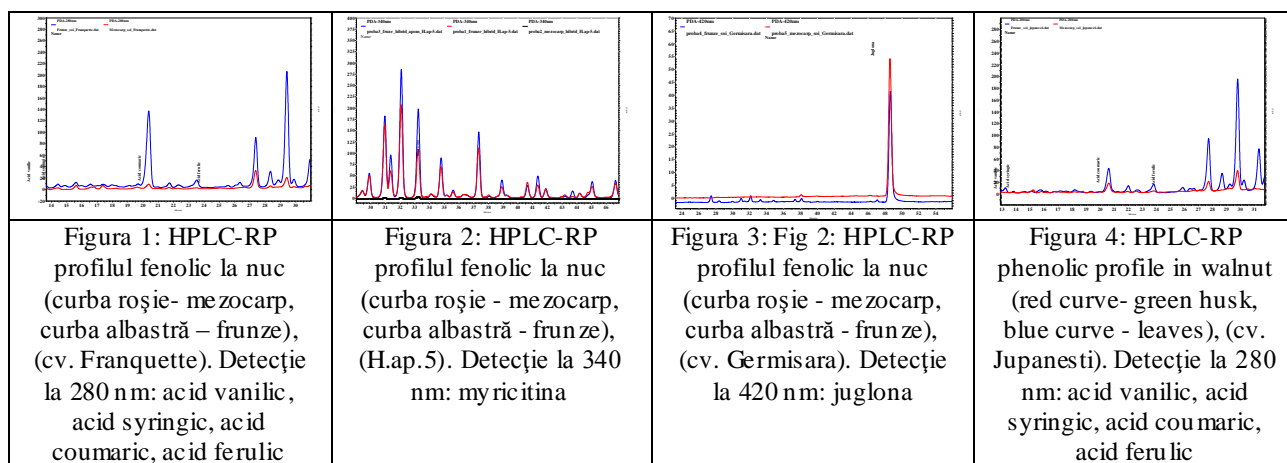
Pentru analiza diversității genetice au fost folosite datele obținute prin analiza frunzelor de la 5 soiuri (Germisara, Jupânești, Valcor – soiuri românești și Franquette, Vina- soiuri străine) și doi hibrizi apomictici (H.ap.5 și H.ap.28). Myricitina a furnizat cele mai multe informații, a urmat (în ordinea descrescătoare a conținutului) juglona, acidul vanilic, acidul coumaric, acidul syringic și în cele din urmă, acidul ferulic (tabelul 2). Profilurile fenolice sunt suficient de specifice pentru cele 7 probe (tabelul 2, figura 1,2,3,4), astfel încât în funcție de măsura euclidiană, afinitatea din punct de vedere taxonomic poate fi determinată distinct.

Tabelul 2: Compoziția fenolică a frunzelor de nuc* (mg/100 g probă)

Compusul / Genotipul	Myricitin	Acid vanilic	Acid syringic	Acid coumaric	Acid ferulic	Juglona
Germisara	25.475	1.966	2.342	0.271	0.972	22.824
Jupanesti	46.119	3.369	2.073	1.722	2.333	5.443
Franquette	16.052	1.504	1.379	0.620	0.367	15.208
Vina	17.066	1.611	1.550	0.483	0.629	12.552
Valcor	29.189	3.565	2.382	2.442	1.427	5.418
H.ap.5	29.344	4.395	2.362	3.210	0.341	7.883
H.ap.28	29.536	3.965	2.565	2.044	1.684	8.165
Media	27.540	2.910	2.093	1.541	1.107	11.070
Abatere standard (SD)	10.009	1.191	0.455	1.115	0.743	6.320
Minimum	16.052	1.504	1.379	0.271	0.341	5.418
Maximum	46.119	4.395	2.565	3.21	2.333	22.824
Confidence level(95.0%)	9.256	1.102	0.421	1.031	0.687	5.845
Coeficient de variație	36,34	40,92	21,73	72,35	67,11	57,09

SD = standard deviation; *Valorile reprezintă media a trei determinări pentru fiecare compus

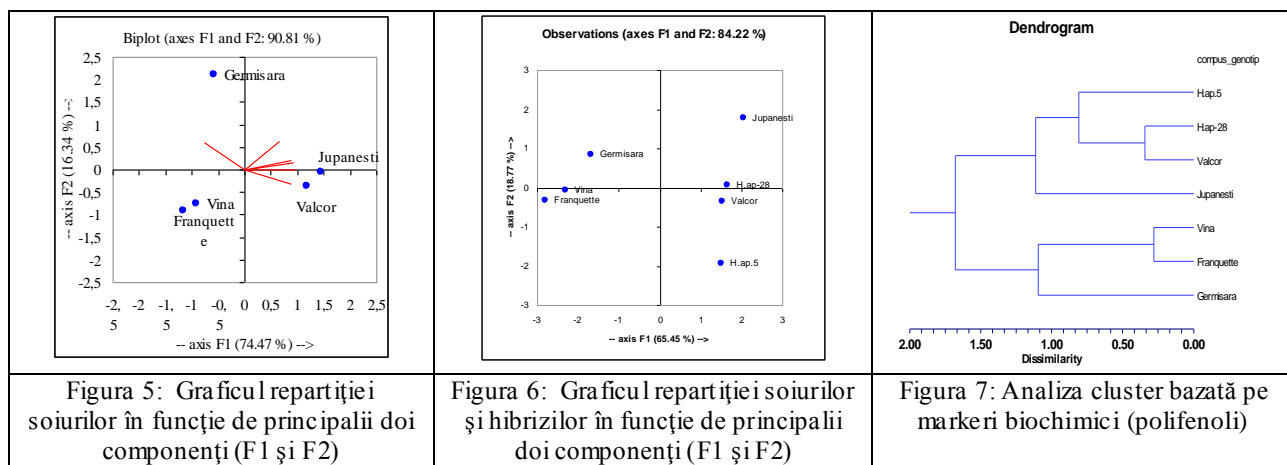
O prima grupă de compuși fenolici, cu timpul de retenție cuprins între 14,41 și 25,07 min, cuprinde compușii acid vanilic, acid syringic, acid coumaric și acid ferulic (figura 1, 4) Datele spectrale s-au acumulat la 280 nm. La 34,90 min și 340 nm a fost identificată myricitina (figura 2), iar juglona la 420 nm și 48,73 min (figura 3). Conținutul de myricitină s-a găsit în cele mai mari concentrații (16,052-46,119 mg/100g), urmat de juglona (5,418-22,824 mg/100g). Pe de altă parte, conținutul de acid ferulic a variat între 0,341 – 2,333 mg/100 g, acidul vanilic între 1,504 – 4,395 mg/100 g, acidul syringic între 1,379-2,565 mg/100 g, acidul coumaric între 0,271-3,210 mg/100g, acestea găsindu-se în cele mai mici concentrații.



Pentru analiza diversității, în cadrul celor 5 soiuri (Germisara, Jupânești, Valcor – soiuri românești și Franquette, Vina- soiuri străine) s-a folosit analiza PCA și analiza cluster (dendograma).

Graficul stabilit în conformitate cu primele două axe PCA (Figura 5), sugerează existența a trei grupe de soiuri. Grupa I, formată din cultivarele 'Franquette' și 'Vina' cu cel mai mic procent de juglona

(13.95% și respectiv 9.45%) și un conținut mai mic de myricetină (22.23% și respectiv 13.80%). Grupa II, cuprinde cultivarul 'Germisara', caracterizate prin cel mai mare procent (74.15%) din juglonă și cel mai scăzut conținut (5.43%) din myricetină. Grupa III, cuprinde cultivarele 'Jupanesti' și 'Valcor' caracterizate prin cel mai scăzut conținut juglonă (0,06% și respectiv 2,36%) și conținut mediu de myricetină (35.26 și respectiv 23.26%), (Tabelul 3).



Prin reprezentarea F1 (myricetin) în funcție de F2 (juglonă), soiurile analizate se grupează în funcție de origine. Astfel, se poate vedea că soiurile 'Franquette' și 'Vina' sunt grupate în zona de valori negative pentru ambele componente principale. Soiurile românești (Germisara, Jupanesti, Valcor) sunt, în principal grupate în zona de valori pozitive pentru cel puțin una din cele două componente principale care au fost analizate (Figura 5). Analiza PCA (Principal Component Analysis), pentru conținutul de polifenoli din frunzele celor 5 soiuri (Germisara, Jupânești, Valcor – soiuri românești și Franquette, Vina- soiuri străine) și 2 hibridi apomictici (H.ap.5, H.ap.28), a arătat că principalii doi componenți (myricetina și juglona) au reprezentat 65,45 % și respectiv 18,77% din variația totală în cadrul setului de date analizat (Figura 6).

Tabelul 3: Contribuția procentală a componentelor la obținerea observațiilor pentru cele 5 soiuri

Genotipul	F1 (Myricitin)	F2 (Juglona)	F3 (Vanillic Acid)	F4 (Syringic Acid)
Germisara	5.431	74.154	0.367	0.048
Jupanesti	35.264	0.069	44.286	0.381
Franquette	22.239	3.957	0.195	43.609
Vina	13.804	9.457	0.779	55.960
Valcor	23.263	2.362	54.373	0.002

Graficul stabilit în conformitate cu primele două axe PCA (F1 și F2) sugerează existența a patru grupe de soiuri. O primă grupă de soiuri, formată din 'Vina' și 'Franquette', cu o contribuție procentuală ridicată la myricetină (19,14%, respectiv 28,13%) și scăzută la juglonă (0,061% respectiv 1,44%). Grupa II, cuprinde soiul Germisara, caracterizat printr-un conținut procentual mediu la juglonă și myricetină (9,01 % respectiv 10,24%), (Tabelul 4).

Tabelul 4: Contribuția procentuală a componentelor asupra observațiilor (%) la cele 5 soiuri și 2 hibridi apomictici

Soiul	F1 (Myricitin)	F2 (Juglona)	F3 (Acid vanilic)	F4 (Acid syringic)	F5 (Acid coumaric)	F6 (Acid ferulic)
Germisara	10.244	9.019	59.708	3.497	3.229	0.016
Jupanesti	15.452	40.379	12.970	16.611	0.125	0.178
Franquette	28.314	1.446	10.459	1.214	4.902	39.380
Vina	19.148	0.061	10.643	5.984	0.555	49.323
Valcor	8.545	1.497	0.558	17.434	49.809	7.872
H.ap.5	8.352	47.555	0.858	25.393	0.398	3.159
H.ap-28	9.945	0.044	4.803	29.867	40.983	0.072

Soiurile 'Valcor' și 'Jupânești', precum și hibridii apomictici (H.ap.5, H.ap.28) s-au grupat în aria valorilor pozitive, pentru cel puțin unul din componenți. Ca urmare, pot fi identificate 2 grupe. Grupa III, cuprinde soiul 'Valcor' și hibridul H.ap.5, cu o contribuție procentuală scăzută pentru myricitin (8.54% respectiv 8,35%), scăzută pentru juglonă la Valcor (1,49%) și ridicată pentru hibridul H.ap.5 (47,55%). Grupa IV, cuprinde soiul 'Jupânești' și hibridul H.ap.28, cu conținut procentual pentru myricitină de 15,45%, respectiv 9,94%, iar pentru juglonă 40,37%, respectiv 0,044% (Tabelul 4).

În urma acestei analize a datelor s-a constatat că, prin reprezentarea F1 (myricetină) funcție de F2 (juglonă), soiurile s-au repartizat în patru grupe în funcție de originea geografică. Astfel, soiurile 'Franquette' și 'Vina' sunt grupate pe zona valorilor negative pentru cele două componente principale. Soiuri românești ('Germisara', 'Jupanești', 'Valcor') sunt în principal grupate în zona de valori pozitive pentru cel puțin unul dintre cele două componente principale care au fost analizate (Figura 6). Gruparea celor doi hibridi apomictici analizați în zona soiurilor românești, sugerează ideea că pot proveni din acestea.

Pentru a obține informații suplimentare despre similitudinea dintre soiurile și hibridii analizați, s-a folosit analiza cluster. Analiza cluster a fost folosită cu succes în studiul relațiilor taxonomice la plante. Analiza grafică (Figura 7) arată existența a cinci grupuri. Așezarea celor cinci soiuri și doi hibridi apomictici, este similară analizei PCA. O primă grupare a permis așezarea soiurilor și hibridilor analizați în 2 grupe, dendogram distance 1,67. Prima grupă cuprinde soiurile 'Germisara', 'Vina' și 'Franquette', soiuri ce se găsesc, prin analiza PCA, în zona valorilor negative pentru componentul principal myricitină. A doua grupă cuprinde soiurile 'Jupânești', 'Valcor' și hibridii H.ap 5, H.ap.28, ce se găsesc în analiza PCA în zona valorilor pozitive pentru componentul myricitină. În cadrul acestor grupe, se detașează soiurile 'Vina' și 'Franquette', dendogram distance 0,281; soiul 'Valcor' și H.ap.28 dendogram distance 0,344. Diferența procentuală dintre acestea este 0,00.

În concluzie, acest studiu sugerează că:

- Tehnica descrisă pare a fi destul de utilă pentru analiza compușilor fenolici din frunzele de nuc.
- Polifenolii analizați au fost prezenți în toate genotipurile, dar diferențele apar în ceea ce privește cantitatea.
- Acest set de compuși, atunci când sunt determinați calitativ și cantitativ, pot să definească afinitatea din punct de vedere taxonomic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

- Amaral J.S., R. M. Seabra, P. B. Andrade, P. Valentão, J. A. Pereira, F. Ferreres. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Molecules* 13, 2008. pp: 1321-1332.
- Claudot A.C., A. Drouet, C. Jay-Allemand. Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated hybrid walnut trees. *Plant Physiol. Biochem.* 30, 1992. pp: 61-68.
- Cosmulescu S., I. Trandafir, Gh. Achim, M. Botu, A. Baciu, M. Gruia. Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38 (1), 2010.
- Jay-Allemand C., D. Cornu, J.J. Macheix. Biochemical attributes associated with rejuvenation of walnut tree. *Plant Physiol. Biochem.* 26, 1988. pp:139-144.
- Hubáček J., J. Lachman. Chemotaxonomic study of selected barley varieties (*Hordeum sativum* L.). *Rostlinná výroba*, 23, 1977. pp: 151-158.
- Prasad R.B.N. Walnuts and pecans. In: B. Caballero, L.C. Trugo and P.M. Finglas (eds.), *Encyclopaedia of food sciences and nutrition*, Academic Press, London, 2003. pp: 6071-6079.
- Schieber A., P. Keller, R. Carle. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 910, 2001. pp: 265-273.
- Smith P.M. *The chemotaxonomy of plants*. United Kingdom, Edward Arnold (Publishers) Ltd. 1976
- Solar A., M. Colarič, V. Usenik, F. Štampar. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 170, 2006. pp: 453-461.
- Van Sumere C., L. De Cooman, E. Everaert, D. De Keukeleire, K. Vande Castele. Phenolic markers in chemotaxonomy and plant cultivar recognition. In Scalbert, A. ed. *Polyphenolic Phenomena*. Paris, INRA editions, 1993. pp: 257-266.
- Venkataraman K. Wood phenolics in the chemotaxonomy of the Moraceae. *Scientia Horticulturae* Volume 58, Issues 1-2, 1994. pp: 41-55.